

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-276170

(43)Date of publication of application : 12.10.1999

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
//(C12N 15/09
C12R 1:69)

(21)Application number : 10-105712

(71)Applicant : AMANO PHARMACEUT CO LTD
AGENCY OF IND SCIENCE &
TECHNOL

(22)Date of filing : 31.03.1998

(72)Inventor : MACHIDA MASAYUKI
YAMAGUCHI SHOTARO

(54) NEW PROMOTER DERIVED FROM GENUS ASPERGILLUS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new promoter comprising a DNA derived from the genus *Aspergillus* having a specific base sequence and allowing a mold belonging to the genus *Aspergillus* transformed by a vector comprising the DNA sequence to produce a foreign protein.

SOLUTION: This new promoter is shown by a base sequence of, e.g. formula I or II and derived from *Aspergillus oryzae* belonging to the genus *Aspergillus*, and a foreign protein may be produced by a mold belonging to the genus *Aspergillus* transformed by a vector comprising the promoter sequence. The promoter is obtained by extracting the whole DNA from *Aspergillus oryzae* grown in the presence of glucose, passing it through an oligo(dT)cellulose column to separate mRNA therefrom, synthesizing cDNA by using it, conventionally forming a cDNA library, and cloning it so as to search a gene highly expressed, thus obtaining the resultant promoter comprising e.g. an alcohol dehydrogenase gene strongly expressed in the presence of glucose.

1

II

161

161

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-276170

(43) 公開日 平成11年(1999)10月12日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	F I
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00
// (C 1 2 N 15/09	Z N A	Z N A A
C 1 2 R 1:69)		

審査請求 未請求 請求項の数 5 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平10-105712

(22) 出願日 平成10年(1998) 3 月31日

(71) 出願人 000216162

天野製薬株式会社

愛知県名古屋市中区錦 1 丁目 2 番 7 号

(71) 出願人 000001144

工業技術院長

東京都千代田区霞が関 1 丁目 3 番 1 号

(72) 発明者 町田 雅之

茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 工業技術

院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 山口 庄太郎

イギリス、22 キャンスタブル ロード

イートン、ナルニッチ NR 4 6 RN

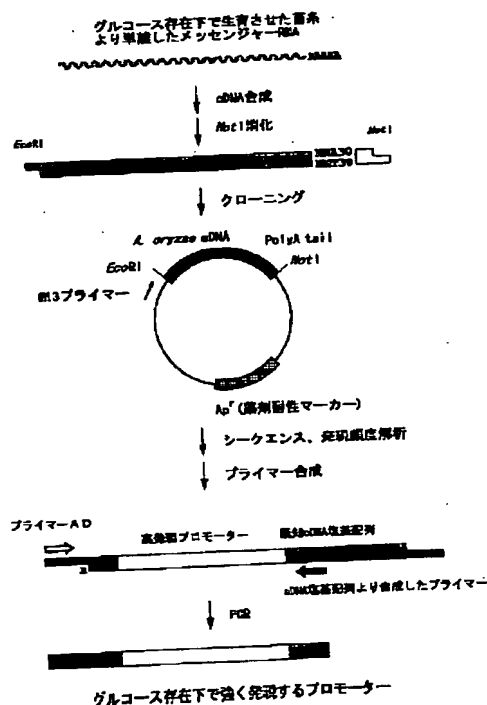
(74) 指定代理人 工業技術院生命工学工業技術研究所長

(54) 【発明の名称】 アスペルギルス属由来の新規なプロモーター

(57) 【要約】

【目的】 本発明は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属糸状菌の新規プロモーターを提供する。

【構成】 アスペルギルス・オリゼのアルコール・デヒドロゲナーゼ I (alcohol dehydrogenase I) 遺伝子、コプロポルヒリノーゲン III オキシダーゼ (coproporphyrinogen III oxidase) 遺伝子、ヘキソース・トランスポーター (hexose transporter) 遺伝子、ヒストン H4.1 (histon H4.1) 遺伝子、40S リボソーム蛋白質 S17 (40S ribosomal protein S17) 遺伝子又は 40S リボソーム蛋白質 S28 (40S ribosomal protein S28) 遺伝子のプロモーター。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号：1乃至配列番号：6に示した塩基配列で示されるDNA。

【請求項2】 請求項1記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA。

【請求項3】 アスペルギルス属由来である請求項1又は請求項2記載のプロモーター。

【請求項4】 アスペルギルス・オリゼ由来である請求項1又は請求項2記載のプロモーター。

【請求項5】 アスペルギルス・オリゼのアルコール・デヒドロゲナーゼI (alcohol dehydrogenase I) 遺伝子、コプロポルヒヒリノーゲンIIIオキシダーゼ (coproporphyrinogen III oxidase) 遺伝子、ヘキソース・トランスポートター (hexose transporter) 遺伝子、ヒストンH4.1 (histon H4.1) 遺伝子、40Sリボソーム蛋白質S17 (40S ribosomal protein S17) 遺伝子、40Sリボソーム蛋白質S28 (40S ribosomal protein S28) 遺伝子の何れかより選ばれた請求項4記載のプロモーター。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術】 本発明は、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属糸状菌の新規プロモーターに関する。更に詳細には、本発明はアスペルギルス・オリゼ由来の新規プロモーター配列をクローニングし、アスペルギルス属糸状菌を宿主として有用蛋白質およびペプチドを発現させるために必要なDNA断片を有するプラスミドと、それを用いた有用蛋白質およびペプチドの製造法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】 糸状菌は、デンプン、蛋白質、脂質、セルロース等を加水分解する各種加水分解酵素をはじめ多くの有用酵素を菌体外に多量に分泌するため、古くよりこれら有用酵素の給源として利用されてきた。従って、糸状菌に関する培養法、生成物蛋白質の分離精製法などの発酵技術の古い歴史と研究成果の裏付けがあり、多くの菌株の安全性が広く認知されている。また、真核生物であるが故に哺乳動物などの高等生物と同様に蛋白質の糖鎖付加機構を有している。

【0003】 これらの理由により、糸状菌を異種蛋白質の高生産用宿主として利用することが期待されていた。遺伝子工学技術においては、目的とする蛋白質の生産量は、プロモーター、ターミネーターなどの転写に関わる因子、アミノ酸コドンの種類など翻訳に関わる因子、蛋白質への糖鎖付加、発現した蛋白質の細胞内での存在様式 (分泌過程における移動も含む) などの翻訳後に関わる因子、遺伝子のコピー数の因子、宿主由来のプロテアーゼなど発現蛋白質の安定性に関わる因子など多くの因子により影響を受ける。これらのうちもっとも重要であり制御しやすい因子は、プロモーターの選択である。

【0004】 この見地から、糸状菌における強力なプロ

モーターを利用した例は、たとえばアスペルギルス・ニガー由来のグルコアミラーゼ遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 5, 368 (1987)]、トリコデルマ・リーセイ由来のセロビオハイドロラーゼI遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 7, 596 (1989)]、アスペルギルス・オリゼ由来の α -アミラーゼ遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 6, 1419 (1988)] (特開昭62-272988)、アスペルギルス・ニドランス由来のアルコールデヒドロゲナーゼI遺伝子のプロモーター [Biotechnology, 5, 713 (1987)]、アスペルギルス・オリゼ、アスペルギルス・ニガーのグリセルアルデヒド-3-ホスフェイト デヒドロゲナーゼ (GAP-DH) のプロモーターを利用して異種蛋白質の製造 (特開平3-187392) の場合などがある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明はアスペルギルス・オリゼ由来の新規なプロモーターを得、この発現系を使用して異種蛋白質を製造する方法を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は上記目的を達成するために鋭意研究し、アスペルギルス・オリゼから新規なプロモーター配列をクローニングすることに成功し、本発明を完成した。即ち、本発明によりアスペルギルス・オリゼ由来の新規なプロモーターが提供され、それを使用する点で新規なものである。

【0007】 本発明においては、以下のようにして上記の目的を達することが出来た。例えば、グルコース存在下で強く発現する遺伝子の同定と単離は、以下のようにしてできる。

【0008】 糸状菌をグルコースを唯一の炭素源とした培地で培養し、得られた菌体からポリA付加RNAを取得する。このポリA付加RNAを用いてcDNAを合成し、適当なベクターを用いてcDNAライブラリーを構築する。

【0009】 このライブラリーの中から独立したクローンを無作為に多数、例えば500個選別 (約8,000遺伝子で構成されている麹菌であれば約500個で推定できると考えられる。) し、プラスミドDNAを抽出して約800bpの塩基配列を解析する。

【0010】 こうして得られた塩基配列は、各cDNAのコード領域を5'末端領域の塩基配列を含み、DNA塩基配列データベースに対して相同性解析を行うことにより、含まれる遺伝子を推定する。さらに、全ての塩基配列間で総当たりで相同性検索を行うことにより、それぞれのcDNAの頻度解析を行い、培地中のグルコース存在下で強く発現している遺伝子を同定することができる。

【0011】 次に、この様にして同定したグルコース存在下で強く発現している遺伝子のプロモーターの単離

は、通常よく用いられる方法、即ち上記で得られた各 cDNA をプローブにして遺伝子ライブラリーからスクリーニングすること等により成し遂げられるし、或いは PCR (Polymerase chain reaction) を用いる方法によっても成し遂げられる。

【0012】PCR を用いる方法の一例として、以下の方法を用いることが出来る。糸状菌からゲノム DNA を抽出して *EcoRV*、*ScaI*、*DraI*、*PvuII* あるいは *SspI* 等の 6 bp を認識して平滑末端に切断するそれぞれの制限酵素で完全消化し、そのゲノム DNA 断片の両端に適当なアダプターを連結する。

【0013】この両端にアダプターが連結されたゲノム DNA 断片を鋳型として、cDNA の塩基配列から合成したプライマーおよびアダプターの本鎖部分の配列を有するプライマーを用いて PCR を行う。増幅産物を電気泳動で確認して 1~2 kb 程度の長さを有する DNA 断片を電気泳動によって単離・精製し、適当なクローニングベクターに連結して大腸菌にクローニングする。

【0014】数個の独立したクローンからプラスミドを調製してクローニングした DNA 断片の両末端の塩基配列を解析し、cDNA と相同な塩基配列を有し cDNA の上流に位置する DNA 断片をこの cDNA 由来の遺伝子のプロモーターと判断する。

【0015】プロモーター領域を有する DNA 断片のうち、翻訳開始コドンより上流 1 kb 程度以上を有する DNA 断片を選別し、全塩基配列を決定し、グルコース存在下で強く発現している遺伝子のプロモーターの単離を行うことが出来る。上述した工程を図 1 に示す。

【0016】本発明のプロモーターは上述のようにして決定された塩基配列に対してストリンジェントな条件、例えば、0.1% SDS (60℃、0.3mol NaCl、0.03M クエン酸ソーダ) でハイブリダイズする塩基配列をも包含する。

【0017】本発明のプロモーターは、その下流に、所望の有用タンパク質遺伝子を連結してベクターを構築し、該ベクターで宿主を形質転換し、それを培養することにより、有用タンパク質を著量生産させることができる。

【0018】宿主としては、アスペルギルス・オリゼをはじめ、その他のアスペルギルス属、ノイロスポラ属、ペニシリウム属、トリコデルマ属などの微生物が使用できる。特に、発現効率の点から、宿主として、アスペルギルス・オリゼを用いることが好ましい。

【0019】得られたプロモーターへの有用タンパク質遺伝子の連結、ベクターへの挿入は、それ自体公知の方法で行うことができる。有用タンパク質遺伝子としては、特に限定するものではない。また、ベクターとしては、アルギニン要求性などの栄養要求性相補遺伝子、アセトアミド資化などの炭素、窒素源資化遺伝子、オリゴマイシン耐性などの薬剤耐性遺伝子などが挙げられる。

【0020】宿主の形質転換も自体公知の方法で行うことができる。また、該形質転換体の培養も常法に従って、所望のタンパク質に適した培地、培養条件を適宜選択することにより行うことができ、得られたタンパク質の採取、精製も公知の方法で行うことができる。

【0021】以下、実施例を参照しながら本発明を詳細に説明するが、実施例に使用したプラスミドなどは一例として挙げたものであり、本発明に使用できるものであればこれらに限定されるものではない。

【0022】

【実施例】実施例 1 グルコース存在下で高発現する遺伝子の同定

(1) 菌体の取得

アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) ATCC 42149 を以下の培養条件で培養した。YPD 培地 (酵母エキス 1%、ポリペプトン 2% 及びグルコース 2% よりなる培地 (pH6.0) に本菌株を接種し、30℃において 22 時間通気攪拌培養し、菌体をろ過して得た。得られた湿菌体 4 g を液体窒素中で凍結し、そのまま、液体窒素及び海砂を入れた乳鉢に移し、乳棒で微細な粉末とした。

【0023】(2) cDNA ライブラリーの作製
シグウィン (Chigwin) 等の方法 [バイオケミストリー (Biochemistry)、18 巻、5294 頁 (1979)] に従って 4.6mg の全 RNA を得た。その後、オリゴ (dT) セルロース・カラム (ファルマシア社) に供し、1.4mg の全 RNA から 30 µg のポリ A 付加 RNA 画分を得た。

【0024】このポリ A 付加 RNA を用いて、Not I 制限酵素切断部位を含むプライマー (5'-TTCTAGAATTCAGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTIVN-3' : ここで V は A, C, G の混合、N は A, C, G, T の混合を表す) 及び MMLV リバーストランスクリプターゼ (RNaseH⁻) (クロンテック) [逆転写酵素] を用いて一本鎖 cDNA を合成し、さらに *E. coli* DNA polymerase I (クロンテック)、*E. coli* DNA ligase (クロンテック) および *E. coli* RNase H (クロンテック) により、両端が平滑化された二本鎖の cDNA とした。

【0025】cDNA 分離用カラム (クロンテック) を用いたゲル濾過により短鎖 cDNA を除去した後、*EcoRI* 制限酵素切断部位を含むアダプター (5'-AATTCGGCAGGAGG-3' 及び 5'-CCTCGTCCG-3') を連結した。

【0026】こうして得られた cDNA 断片は、Not I 制限酵素で完全消化した後、*EcoRI* および Not I 制限酵素で消化したプラスミドベクター pUC19 に連結した。このプラスミドを大腸菌に形質転換することにより、ほぼ完全長の cDNA を含む大腸菌 cDNA ライブラリーを構築した。

【0027】(3) 高発現する遺伝子の探索

このライブラリーの中から独立したクローンを無作為に 500 個選別し、プラスミド DNA を抽出して、M13 ユニバーサルプライマー (5'-CACGACGTTGTAACACGAC-

3')、Taq DNAポリメラーゼ (パーキン・エルマー社)、DNAサーマル・サイクラー (パーキン・エルマー社) 及びDNAシーケンサー (LI-COR社、モデル4000L) を用いたサイクル・シーケンス法により約800bpの塩基配列を解析した。

【0028】こうして得られた塩基配列は、各cDNAの5'末端領域の塩基配列を含んでいる。GenBank DNA塩基配列データベースに対して、BLASTXを用いて相対性解析を行うことにより、含まれる遺伝子を推定し

た。

【0029】さらに、Sequencher (GeneCodes社) を用いて全ての塩基配列間で総当たりで相対性検索を行うことにより、それぞれのcDNAの頻度解析を行い、培地中のグルコース存在下で強く発現している遺伝子のリストを作製した。

【0030】

【表1】

Gene name	Score	Source
Alcohol dehydrogenase I	11	Af
Coproporphyrinogen III oxidase	4	Sc
Hexose transporter	5	Sc
Histon H4.1	4	An
40S Ribosomal protein S17	2	Sc
40S Ribosomal protein S28	2	Sc

【0031】表中においては、以下のように示す。

Score : ランダムに選んだ600のcDNA配列解析での出現頻度

Source : GenBankデータベースに対するホモロジーサーチでヒットしたもの

Sc=Saccharomyces cerevisiae

Af=Aspergillus flavus

An=Aspergillus nidulans

【0032】その結果、グルコース存在下で強く発現している遺伝子としてアルコール・デヒドロゲナーゼI (alcohol dehydrogenase I) 遺伝子、コプロポルフィリンIIIオキシダーゼ (coproporphyrinogen III oxidase) 遺伝子、ヘキソース・トランスポーター (hexose transporter) 遺伝子、ヒストンH4.1 (histon H4.1) 遺伝子、40Sリボソーム蛋白質S17 (40S ribosomal protein S17) 遺伝子、40Sリボソーム蛋白質S28 (40S ribosomal protein S28) 遺伝子を新たに発見した。

【0033】実施例2 アルコール・デヒドロゲナーゼ

IのcDNAに対応するのプロモーター領域の取得

Aspergillus oryzae RIB-40株 (ATCC 42149) からティンバレークとバーナード (Timberlake and Bernard) の方法に従って得たゲノムDNAを、6bpを認識して平滑末端に切断するEcoRVで完全消化し、(P)5'-ACCTGCCC-3'(NH2)および5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGCAGGT-3'からなるアダプターを連結した。

【0034】このゲノムDNA断片を鋳型とし、センスプライマーとしてアダプターの一本鎖部分の配列を有するプライマーAD (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') を、アンチセンスプライマーとしてアルコール・デヒドロゲナーゼI cDNAの塩基配列から合成したプライマー#1 (5'-ACGAGGGCATCTTCACTCGGAGG-3') を用いてPCRを行った。PCR反応は、Expand HF (ペーリンガー・マンハイム社) を用い、DNAサーマル・サイクラー (パーキン・エルマー社) により行った。反応溶液の組成は以下の通りである。

【0035】

(終濃度)

H ₂ O	20.25	μl	
[10×]Reaction buffer	2.5	μl	[1×]
dNTPs, Mix 10 mM	0.5	μl	200 μM
センスプライマー(プライマーAD)	0.25	μl	5 μM
アンチセンスプライマー(プライマー#1)	0.25	μl	5 μM
*template(DNA 0.2 μg)	1	μl	
Expand HF DNAポリメラーゼミックス	0.25	μl	1.25 u/TEST
	25	μl	

*EcoRV分解したDNAを0.2 μg/10 μl になるようにTEでとかけたもの

【0036】上記の反応液25 μlを0.2 ml反応チューブ中で混合してDNA Thermal Cyclerにセットし、以

下のような温度設定によりステップダウンPCRを行った。

【0037】

95℃、1分 1サイクル
 95℃、30秒 74℃、15秒 70℃、3分 3サイクル
 95℃、30秒 70℃、15秒 70℃、3分 3サイクル
 95℃、30秒 66℃、15秒 70℃、3分 3サイクル
 95℃、30秒 62℃、15秒 70℃、3分 3サイクル
 95℃、30秒 58℃、15秒 70℃、3分 3サイクル
 95℃、30秒 54℃、15秒 70℃、3分 20サイクル

【0038】増幅産物を1.5%アガロース・ゲル電気泳動で確認して2.0 kbのDNA断片を得た。このDNA断片をアガロース・ゲル中より単離・精製し、TAKARA クローニングベクターpCRII (インビトロジェン社) に連結して大腸菌にクローニングした。

【0039】そのクローニングからプラスミドを調製してクローニングしたDNA断片の両末端の塩基配列を解析し、本DNA断片がアルコール・デヒドロゲナーゼIと相同な塩基配列及びその上流に翻訳開始コドンより上流1829bpのDNA領域を含むことを確認した。

【0040】この様にして、1829bpのアルコール・デヒドロゲナーゼI遺伝子のプロモーターを取得した。その全塩基配列を決定し、配列番号：1に示す。

【0041】実施例3 コプロポルヒリノーゲンIIIオキシダーゼのcDNAに対応するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、コプロポルヒリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6 bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてDraIを用いた。

【0042】また、アンチセンスプライマーとして、コプロポルヒリノーゲンIIIオキシダーゼcDNAの塩基配列から合成したプライマー#2 (5'-GATCGCTTTTCCGCTGAGTATCTG-3')を用いた。こうして得られた1887bpのコプロポルヒリノーゲンIIIオキシダーゼ遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：2に示す。

【0043】実施例4 ヘキソース・トランスポーターのcDNAに対応するプロモーター領域の取得
 実施例2と同様にして、ヘキソース・トランスポーター遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6 bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてEcoRVを用いた。

【0044】また、アンチセンスプライマーとして、ヘキソース・トランスポーターcDNAの塩基配列から合成したプライマー#3 (5'-CTGGGGTAGGACTATCGGAGTCT-3')を用いた。こうして得られた2091bpのヘキソース・トランスポーター遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：3に示す。

【0045】実施例5 ヒストンH4.1のcDNAに対するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、ヒストンH4.1遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6 bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてSspIを用いた。

【0046】また、アンチセンスプライマーとして、ヒストンH4.1cDNAの塩基配列から合成したプライマー#4 (5'-AGCTTCAGTGGGAAAATGTCGAGA-3')を用いた。こうして得られた1915bpのヒストンH4.1遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：4に示す。

【0047】実施例6 40Sリボソーム蛋白質S17のcDNAに対するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、40Sリボソーム蛋白質S17遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6 bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてEcoRVを用いた。

【0048】また、アンチセンスプライマーとして、40Sリボソーム蛋白質S17 cDNAの塩基配列から合成したプライマー#5 (5'-GCTGGGGTAGTAACGCTCAATGA-3')を用いた。こうして得られた1569bpの40Sリボソーム蛋白質S17遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：5に示す。

【0049】実施例7 40Sリボソーム蛋白質S28のcDNAに対するプロモーター領域の取得

実施例2と同様にして、40Sリボソーム蛋白質S28遺伝子のプロモーターを取得した。この場合、アスペルギルスオリゼのゲノムDNAを完全消化する際に、6 bpを認識して平滑末端に切断する制限酵素としてSspIを用いた。

【0050】また、アンチセンスプライマーとして、40Sリボソーム蛋白質S28 cDNAの塩基配列から合成したプライマー#6 (5'-AAGCACCACCGAAGCGAGAGGACT-3')を用いた。こうして得られた1631bpの40Sリボソーム蛋白質S28遺伝子のプロモーターの全塩基配列を配列番号：6に示す。

【0051】実施例8 アルコール・デヒドロゲナーゼI遺伝子プロモーターによる大腸菌由来β-グルクロニダーゼのアスペルギルス・オリゼでの発現

(1) 大腸菌由来β-グルクロニダーゼ遺伝子発現カセットの構築

実施例2で取得した約2.0 kbのDNA断片を鋳型にして、PCRによりアルコール・デヒドロゲナーゼI遺伝子プロモーターを含む1.0 kbのDNA断片を得た。PCR反応に用いたプライマーは、
 センスプライマー：5'-GTCCAGCACTATTACGGAGTACATAGC-3'
 アンチセンスプライマー：5'-GTCCACTTTGACTTTGGGATCTTGTGTT-3'
 であった。

【0052】この断片を制限酵素SalI消化後、大腸菌

由来 β -グルクロニダーゼ遺伝子を有するプラスミドpBRJ275 (4.5 kb、クロンテック社) のSalI部位に挿入し、転写方向が順方向に挿入されたプラスミドpBRJAP (5.5 kb) を得た。

【0053】次に、アスペルギルス・オリゼのエノラーゼ遺伝子を含む2.9-kb BglII断片 (Biosci. Biotech. Biochem., 60巻161-163頁, 1996) からエノラーゼ遺伝子のターミネーター領域0.6-kb EcoRV-HindIII断片をpBluescript (ストラタジーン社) のEcoRV-HindIII部位にサブクローニングし、プラスミドpBET (3.6 kb) を得た。

【0054】プラスミドpBRJAPからアルコール・デヒドロゲナーゼI遺伝子プロモーターとそれに続く大腸菌由来 β -グルクロニダーゼ遺伝子を含む2.8-kb PstI-EcoRI断片を取得し、これをプラスミドpBETのPstI-EcoRI部位に挿入して、大腸菌由来 β -グルクロニダーゼ遺伝子発現カセットを含むプラスミドpBAPETG (6.4 kb) を得た。

【0055】(2) 大腸菌由来 β -グルクロニダーゼ遺伝子発現カセットをアスペルギルス・オリゼへ導入するためのプラスミドの構築

プラスミドpBAPETGから制限酵素PstI及びHindIII消化により、3.4-kbの大腸菌由来 β -グルクロニダーゼ遺伝子発現カセットを取得して、アスペルギルス・オリゼの形質転換マーカーとしてniaD遺伝子を有するプラスミドpN3 (特開平6-245777) のPstI-HindIII部位に挿入し、本発現カセットをアスペルギルス・オリゼへ導入するためのプラスミドpNAPETG (11.6 kb) を構築した。

【0056】(3) 大腸菌由来 β -グルクロニダーゼ遺伝子のアスペルギルス・オリゼでの発現
プラスミドpNAPETGをUnkelsらの方法 (Mol. Gen. Gene t., 218巻 99-104頁, 1989) に従ってアスペルギルス・オリゼniaD欠損株A01.1に導入した。得られた形質転換体を3%グルコース及び50 μ g/ml 5-ブromo-4-クロロ-3-インドール- β -D-グルクロニドを含むCzapek-Doxプレー

ト上で30Cで10日間培養したところ、コロニーが青色を呈した。対照として得た形質転換マーカーのみを有するプラスミドpN3由来の形質転換体は青色を呈しなかった。このことは大腸菌由来 β -グルクロニダーゼ遺伝子がアスペルギルス・オリゼで発現し、発現した β -グルクロニダーゼ酵素が基質5-ブromo-4-クロロ-3-インドール- β -D-グルクロニドに作用したことを示す。

【0057】青色を示した形質転換体の1つを栄養培地で生育させ集めた菌体を洗浄後、3%グルコースを含むCzapek-Dox培地で8時間培養し、得られた菌体の無細胞抽出液中の β -グルクロニダーゼ活性をJeffersonらの方法 (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83巻, 8447-8451, 1986年) で測定したところ、比活性は78 nmol p-ニトロフェノール/min/mg-蛋白質であった。これに対し、pN3由来形質転換体は、<1nmol p-ニトロフェノール/min/mg-蛋白質であった。

【0058】

【発明の効果】本発明により、アスペルギルス・オリゼ由来の新規なプロモーターが提供され、当該プロモーター配列を含むベクターにより形質転換されたアスペルギルス属糸状菌における外来蛋白質の生産が可能である。

【0059】

【配列表】

配列番号: 1

配列の長さ: 1829

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: アスペルギルス・オリゼ

配列の特徴

特徴を示す記号: promoter

配列

```

ATCAATTTAA AGGCTATAGA TGGCTAAGAC TTTGGGGCGG ATACAGATCG GAGTGTTCGA 60
AAGGGGCTTG CTTTCGTTTG ACAGCATAAG CTATCGTGGT GTTACAGCGG TAGCAAACAC 120
GTGGAACAGG AATCCTTATA TTGCTAGAT CATAGACATG TCAAACATTT CAGACAATCC 180
CCTTCACTAG CAGACTACAC ACCCAAATGC TATCAATGAA GAAACGGACA GAATTATATG 240
TACTTCTACA GAGGGTGGAG GTCAGTGGC TTCCGAAAGG TCCTTCGCCC GTAAGGTACT 300
CCTGCTAGGC TTTGAAAGTT TTA AAAACCC CGCTATCTGC CCTCAAAAAC TCTTTTGTCT 360
TTCTCAATTG ACAGGAGGGT CTGCGCGGAG GATGTTATTG TCTCCGTATC CATGAGTGGC 420
ATGACAGAAG ACAGTAATGA TGACGACGAG AACAGAATCA CAAACAAGGT GATCCTACAG 480
ATGTTACTGA AGACACCATC TGCTCTGGGT CGTAAAATTG TCGCTGACTT TCAGGGAGAA 540
GTTCAAGTCT TTCTTTTATA GCAGGAACTG AACC GAATCA CCGACCTCAT GTTCCATACG 600
GCTCGCTGGT TAGTCGTCCG GATATGGGGA AGCTGCCGCT GTTAGGTATC AGGATTATAC 660
ATTAATTTGC GGTGCCTTCC ATATGTTGAG CTCCGTACGT CCGGGGTCAG CATGGGAAGA 720
ATTAGATGAA AGCCGAGCCA TCCCGCATCT CAGCAAATCC CGAGAAAAAG CAAGCAAGAA 780
GGAAGGGAGG GGGTTTAACG GAGTAGATGG GCGGAAGTGG CTGCCATGCT GAACTATTAC 840
GGAGTACATA CCGAGAAGTA CGAACATCCA CCAACACAGA AACCGAACTA GCGGCTCACA 900

```

ATTCCGCTG AGGCATCCAT GCCATCCTTA AAACGACTA GCGTTGCCAC TTCCATTGGC 960
 CATCAGTCCA TCGAAATCAT CTGATTGAA GGTCTCGGT TGAAACGACA CTACAGTATC 1020
 GAACGGGATT TGCTTCTGGA GTCTCCAGC TTGAGGTCCA GTCTATCTTA TTCCGTGGTC 1080
 TATCCCGAAA TTAAGGCTT GACGTTTGAC AGGGAACCTT TAAAAAAGAA GAAAAGAAGA 1140
 TCCTTTCTTC TTTCCCGCA TGAGATACGG CCAATTTTGC TATATTTGGA AAGGCTTGGC 1200
 CCAGGATCTG GACTCACTTG ACAGGGAAGC CTTTTCGGGG GAAGGGAAG TCTGTGACTC 1260
 TGTACGGGAG TACTACTTCG TACTTACCAC TTAACCTTA CTACTGACTT GTTAGTTTAA 1320
 AATCGAAGCA AGTGCTTATG CGCCATCGTA CCGATCGGGC AATGAGCCTA ACCCCGATGA 1380
 CGTCGGCCCA TGGATCTCCT GTTGTGCCC TTCATTCCGT GGGCTGATA TCTTCCAATG 1440
 ATCCAAAAAT CGTTTGATCG TCTTGAATA GCTTCGGTGT GTCTCACAGA TTCTCTTCA 1500
 TGGTTTTTTC ACCTTTCCTT TCCCTCTCTC CGGTGACTCG TTTTCCATAT GTCCGCTAG 1560
 ATGTGCGTGT GTATCACTAC AACACCATTG ACCTTCATTG ACCACTATTA TTCCCAACCCT 1620
 ATAATACGAC GTCATGCCA TGAGATTCCC GCGTTGGATG ACCGTCACCC CACCCATTGC 1680
 TTGGATTCTA GACTTCTATA AGAACTGTCC AGCGTCTCAC CATCAGCTTA CTTCACCTTC 1740
 TCATCACTTC TCTCATCGTG TAAATCAACC CTAACCTCAC CGCAACCTCC TTTCTTCCCT 1800
 TTCTTTCAAC ACAAGATCCC AAAGTCAAA 1829

【0060】配列番号：2

配列の長さ：1887

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：アスペルギルス・オリゼ

配列の特徴

特徴を示す記号：promoter

配列

TAAAGGGAAT ACGGAAAACC TGATATAAAC GCCTGCACAC ATGAAGAATC GCCGCAAGTC 60
 TAACCAGCTC ATTCGCCTCA TACCGGAGTG GCTGGTCACA CACCGGCCC TAAACAAAA 120
 CACATACTGA CGGCGAMGAG TTACATATCT TGGGAGAACT GCTTATCAGA GCTTAAAGAT 180
 CGCCGAAGTG TTTTCCCGG AATACCTAGA GACTATGTCA ATATGTCCG AAAACCGCCT 240
 TTGAAGAATA AAGCATACGT GATATAAGA AAGCCATCTT CATCCTTGTG TTCTTCGTAG 300
 ATGTGCTCA TAAGTCAGC GTTGGTGGT AGCACCTCGT CGACGAAGAT GAAGATAGCC 360
 TTCTCGGGAG ACAGTTTGTG GCGCTTGGG ATAACATAGA CGAACTGCCC GACGGTAAGG 420
 TCTGCAGGAA CAAGATACTT CTTCTTATCA ATAGTGGCGA TGTCCGACTT CTCGACTTTC 480
 TCACAGATTA CCTACAAGTG AAACCTCGAGT TAGCATTCTA AACAAGCGGT GAGTAGACAT 540
 CTTGCTTCCC TGAGGAAGAA CAGCTCAAGG GCAAGAATCA TCTACCAAAG TACGGATCAG 600
 ATAGAGTTGT GCGTACTGGA ATGCGATCAG CGTATTTCTG ACGGATACGC TCGGCTTCTG 660
 CCTTGGCGTT CTCAAAGGGG TGCTCGTCTT TGAACCTGGA GCGCATATTG ATGGATCGAA 720
 TCAGTTAATG GATACAATA GGTCCGTTTA CTATGAGTAC TAGGTACATC AACGAGATAG 780
 ACGTAGATGG TGTGAGTGC AGAGTGATGT AAATGAGATG GTTGGTGTAA TAGGTGAACA 840
 GTAGGAAGAA GGTGGATGAT GACAAAAGG AGAGCAAAGC CCCGCGTCAT GGGTAGTACC 900
 ACGGCTGATA AGGTGCTCAG GCAAGAGCGG ATCACGGGGT GGAGGCGGTG AGCAGCCCCA 960
 CACGTGAGTC ACGATCAGCC TTGAGCCTTC AGGTGCCCCA AGTCATCCAT TTAATTTGAT 1020
 TTGATTTATG TCATCTTCAT TAAACAGATA GCTCATGGAC ACACGTCATA TTCTCACGTG 1080
 GGGAGCCTGG CTGATGTCCC GGTGATATCG GGTCTATAGT GCCCTACAAA GATGTACTAC 1140
 TGAAGTGAAT AGCTGTGGGT AGATGCGGTG TCCGCTCCA CCTGATCAGC GGCTAGACTA 1200
 CTGGTGGCGG CTGTCTCCAT AGAGGGCTCT TGATAGGCTC TGTTCCTGGA ACTTGTAGTC 1260
 GGTATTACAA TCATAGTCAA GTTCCAAGAG TATATATAAT CCCAATTCTG TGATGACTCT 1320
 CACTCAACTT AATCTCATT CAAGCTGCAT TATGACAAGC CAACAACCTT ACATGCATGA 1380
 TCAACTCGAT GGCCAATCCT CAACGCAATG CAAACGAGC AAACACTTCA TCACAGCGTC 1440
 ATCTGACTAA GCAGGAAGTG GGACATGTGC CAAACAATGC AAACAGCGTA TATCCCGGAT 1500
 ATTCTGACGA CGAGTGGTCC CATACAGTTC CAGTCCAGAG AAGGTAACCT CACGATTAGG 1560
 CTACCTCTAT TTCTTGAGAT AGGTGGAGCC GTTTGAGAGA GCGTGCACCC ACTCATATCG 1620
 TTCCGGTACC ACCTGATCAT TCCATCTATC AGCCAATTTT CAATTCATC TTATAAAACT 1680

ATGACCTTGT CCCGCAATA TATGCCTCTT CGGAGGTCAC TCTGCCACTT CTCAGCGCAG 1740
ACCAGACGCG CACCTTGCAA CTTTCAGAAT ACATTTCGCA GATACTCAGC GGAAAAGCGA 1800
TCCAGCGAAC CGAAATCTTT TGTCGTGTGG AGGCCATACC TCCGGCTGGC CATTGGTGTG 1860
CCATTTCATCG GAGCTCTGAT ATATTCC 1887

【0061】配列番号: 3

配列の長さ: 2091

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: アスペルギルス・オリゼ

配列の特徴

特徴を示す記号: promoter

配列

GCARGTAGAH TAGAACACAT TTGCCATCCC GTAGAACCGC CAATAGTAAA AWTTCGGGTG 60
CCATAAGCTC GTCGAGGAAC GTCGGTTGGT TTCCATGAGA TTGCCGCCGA GCAACAATGC 120
ACGACCCCGA TTTTGATTTA CTGATTATAG GATCGTTATT ATAGACACGG AAGGAAAAAG 180
AAGCAAAAGA CAAGCAAAGA CTATCAAGAG ACATGAAGGC AAAAAAGCTA TACAAACACA 240
TGATTTAGGT TGCATGATGA CTTCCGTGAC TGTACATCCA CCGTGCACTG GACCACGAAG 300
AGAGTCGCCT AGATGCTCGA CTTACTARAC GGGTTAACCG CTTCTGTTGA TCTGCATGCA 360
GACTTTTCCC GACTAGACTC AATCCAATAA GGCCGGCGTC CGTACGGCAT GCCGAKATAT 420
CCCGTGTAGG GTAACGCCGT GGTGTGCACC GGRGGCSGAA ATGGTCGAGT CTGAGAGATT 480
TTCCGTCCGC AAGTCTGCCG AGTGGGACCA CGGCCAACGC AGGAGAATAG GAAATCTCAG 540
CCGTGTTTGG TTGAGACTAA AGTTGCACCA KTCAACATCG GCTCTGCTGA AGTCTGCACC 600
TCTCAACACT GGTGGATGA AAATCCGACA GTGGGTCGGA CGCCAAGTGC CTTGATGCCA 660
CGATCCACCA GTCGAACGCA CCAGCAGAAA TTTTCTCCT AAGTTAGGC GAASTATTTC 720
GTATGTGACG TCGAGTTGAC CGAATCGGCA CACCGAGTCA CAAACGGATC ACGNTGCCGA 780
CTTCTCGGAC GGCCGATAGC TTCCGAACGN TTCCAATGAC ATACATACAC AGCAGAAGAC 840
ATGCATGGGA CATTCCTGTA GGTATTGTAG TCAGATGATG TTACCTTCCA CCAATATTG 900
ATTTGTAACC TTCGTATCCA TATTATTTT TGAACCAAGA CTACAGGGA TTGGCACAGA 960
GTTCCGATGC TGCATGAGTT GACTTTATCG GCATCATTAT TACCTTTTAC TACCCGACTC 1020
GGGATCGCCC AGAAATTTTT TTTCTTAGGG TGGATCCATT TAGATCTGCC ATGACTCTTG 1080
GTACCAGCTC GGAACCAGAA AACTTTACTG TGTGTCTTCA GGGGAGCTAT AATTAATTTT 1140
AGGGCAAGGG GGAACAAAAA TGAGTGAGGC AGATTGAAAT GGGCCTCGTT AACATCGTTA 1200
AAACAACTCT GTTGAGAAAG GAGTCAAGGG ATGTAGTGA TCGTCAAATG TAAACAATTG 1260
TCCGTAAATA CCCCCGTACA CACACCAACA GAGTAATTGT GCGTGTGAAT CCTGAGAAGT 1320
ATGTGGCAAA GGAATTAAGC GTGTAACAG AGTCAGTGA CTAATATTA CTACCACCGT 1380
GAGACAACAC GGGAAAAA CACTACGTACT ATCTACAGTG TGAATGCAA TAATCGAGAT 1440
ACTACCATAG GACTACAAA CTTGAATTTA GAGGATTGGG TAATAAAAA TAAAAATAAT 1500
AAAAATAAAA AATAAAAACC AAACCAGACC ATCATGAGAC GCACATGACC TCCCCGTGAC 1560
TACTTTGGTA GAATTCCAGA CTCTCTCAAG TTCGCTTTTC ACCATAGCAA GACGGCGAGC 1620
CCGGCAACGA ACCTCAACCC ATCCATGCCA ACGATAACTT TACTCTTTTG GTCGTCTCCA 1680
GGCACATCCC CACTGTCTCC CCACTCCAAG ACACTCTGTC GAAGCATCCA AGAACACACT 1740
CCGCCCCCCT AGCATGCGAC TATCCTTCCT GGTTCGGCCC TTGAGATCTG GGCCCCCGTT 1800
TTTCTTGCCA TGGTCCCTAC CCGGAGAATG GGGTGTCTC CAATCCCTGG GATGGAGGCG 1860
ACGTTTTGTC TTGCCGACGT ATGCACCGTT CATGTAAAC CTTTCATTTA ATTTCAATT 1920
AAGCGCACTA AATAATTCCA CGATCCGCTT ATTAAGTCC GACTCTGGCT TATATATCTC 1980
CGCGTTCCC ACGTTGCCTC CCGGTTTCC TTCTCTTCT CATCCATCT TTCATCCCTT 2040
CACCATCTG TCTAAGGATT CGTTCGACCA TTGAGGAATC CATCCATCAT T 2091

【0062】配列番号: 4

配列の長さ: 1915

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: アスペルギルス・オリゼ

配列の特徴

特徴を示す記号: promoter

配列

ATTCTATAGA CTTGCTAGAA GTAGAACCCTT CCCTGGTCGT ATATGGAGTA CCGAACGCCG 60
 TGGGCAGTAC ACCAGCAACA CCACCAGCGT ACACACGCTC AACAGTTCCG GTCGCTAAAG 120
 GCGCGCGACC GCGATAGTGG CATACTTCTT ACAAGAGAAA ACAGCGCGAG ATTAAGTCAC 180
 GACAGTAATG AATTGGATTA TTGCTCATAG AATCTGCATT TCGAATCTAT GCCATCCGCT 240
 GGCAATTCAT AGAGAATACC ACTTGGTCAA GTAAAATTTC TTAATGTACA TGCTCGGATG 300
 CATCCCATGA GATCCAATCC ACTCAGCCGC GTCGTCGGCA GCCTACTATT TATTGCGCAG 360
 CAAAACGAAA ACTAATCCCA GTGCCGAAAC CCATTGATAT TCGCAAATGA AAAAAAGAAA 420
 CCCATCATGT ATCGCCAGTC GTGAAAAAGA AATAAAACCC CTAATCGCCT ACCCAGAGAC 480
 AACCAGAAAA ACCGGACTCA TTAGAGAATA ATCTAAGAGC GCTCACCACG GAGACGGCGG 540
 GCGAGCTGGA TGTCCTTGGA CTGGATGGTA ACACGCTTGG CGTGGATGGC GCAGAGGTTG 600
 GTGTCTCGA AAAGAGAGAC GAGGTAGGCC TCAACGGACT CCTGGAGAGC ACCGATGGCG 660
 GAGGACTGGA AACGGAGGTC GGACTTGAAG TCCTGGCGCA TTTCACGGAC CAGACGCTGG 720
 AAGGGGAGCT TCGCGATCAG AAGCTCGGTG GACTTCTGGT AGCGACGGAT CTCACGGAGA 780
 GCGACGGTAC CTTTTCATGA CTGTTAGTGA TGACCGCATG ATGGTTTGGC ACATCATAAG 840
 ATAACCTACC AGGCTTGTA CGGTGAGGCT TCTTGACACC TCCGCTAGAG GGAGCAGCCT 900
 TACGGGCGGC CTTGGAGGCG AGCTGCTTAC GAGGGGCTT GCCACCAGTG GACTTACCTG 960
 GATGGATGTT AGTGATGATG ATTCAAGACG CGATGTATCA CTCATGGGGA CCGGACCTG 1020
 ACGCGGGGCG ACGACACCAC AAGAGAAAGG ATAGTAAGGT TAAGACTTAC GGGCAGTCTG 1080
 CTTAGTTCTG GCCATCTTTA GAGATAAGGT TTGATGGATT TAGTCGACTT TGAGATGAAA 1140
 ATAGATAAAA GTCGATGTTT GTCGATGATA ATGTGTTGGC GGATCAGCAG ATGAAAGAAG 1200
 GATGGAGGAG GCGGGTGGGG GAAGGTATTT GTAGTAAGCG AAGGGTGGCT GGTGATCTGA 1260
 TGGCGTTGCC AGCAATTGG GTGGCCTTAG CGTCGTTTCC CTTTGATCAA AAAAGCGCTC 1320
 GGAAAGCAGC ACACCATAAG CCGTGATTTC GGGGGTCACT TTTGGCTGCA GAATCAAAGG 1380
 GTTACCTTGC GGGCGGTCAA GGAATCCGCG CCCAAGGCAG GAATGAAGTG TGGTCTGTGC 1440
 GTTAAGCGAG TGACGGACCA ATAGAATCGT AGGATCACTG ATCTAGCCTG TCTCCCTACC 1500
 ACGTCTTGAT CCCAACCACC GGTAAAGTAT GTGAAGTAAT TCACTAGATC AAAATGAAAG 1560
 TTGGTATGCT CAGGAATATC TCTGGTCAAT TTTGATCCCT GATCTCGGTG GTTCAGAGGC 1620
 ATTCCTGAG GATCAAAGTT GATCCTAGCG GAATCATCAC TTCTCGGTCA CTTGCGGAC 1680
 AGATCAAACC CGCCGGGAGG ATCCTCGTCT CTCATTGGTC GATCCTCTTG TAGCGCGTGA 1740
 TTCCAACGCC CTCCCCGCGC TCTTCCTTTT CCTATACAAA TATCACCCGT CCCATGGCAG 1800
 CTGTCCCAAT CTTTCCCTTC CCATCTCTCT CACATCTGTC ATCCAATTAA CCACCTATCT 1860
 CTCCACATTT TCCCACTCAA CCTTAAACAA GTTAACTCTT TAATCAACCA TCAAT 1915

【 0 0 6 3 】 配列番号 : 5

配列の長さ : 1569

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : アスペルギルス・オリゼ

配列の特徴

特徴を示す記号 : promoter

配列

ATCGGAGGTC TTGGGCTCAA TGAAGTGAAT ATATAGTGA GGCCTCTCCG CACTACTTTG 60
 TTGAAAGAYA ATCGATACTT GCTCGATTGA GTAGTCAAAG CGCCGAAGTC AGCCTTTCCA 120
 TGGCAATAGT CAAATGAAAT AACTACTGGA CTAGATCTCA TCATCAAACC ATTGTATGTT 180
 TAGCTCACGG GGATGTTGTT CCTCGGTTAC TACCCGCTTT GTAGAGTCAT GGAGCAGAAT 240
 TCCGAAATGA GTTATAGTGG GCAAAAAACA TTATTCTTAT GTTGCCAGAA AAAAATACTA 300
 CGTTTTTCTC CTTCAACCAT TGTCTTGGGA GTCAACTAGC AGCATATCAG ACTGTGACAG 360
 TAGTCCGTTG CCCTCACCGG CCTATCGGAC GAGGTGTTTT TGTGTTGCTA CCCTTCTGGG 420
 TTTAGTGAGT TGGACCAGAT TTTGCTAAAT GTTGACCGTG ACTCGGGTCA CATGAGGAGC 480
 TCTTCAAAGA GTGCGCTATT CCTGAACAGG TACTCTTGAC GCTAGGCAAT TTCAGGCACA 540
 ACTCAAGGCG CCCGCAAGTG CCCGCTCAGT GGCCTACTCG AAAATACCAA CTCTTTGGGT 600
 GTGGTTCCGT ATAAGGGCTT TCGCCTTTAC ATAGTGACAT GAATAACCAC GGAGTATATA 660

```

GGTCCTTGGC TAATCGTGGC AAATCCAAGT ATCGATTCAA CTGCATGATT GTGATAGCTT 720
GGTAGAGTAG CATAGCGGCA AGAGCAATCT CCGAGATGGC TAATATGAAG AATTTTACAA 780
GATACTCGGA CATAAGTCTG CAGAGGTGAC TTCTCAAAGT TCITTCCTGG AGGCTGTTCA 840
ACGCGATGCC ATTCTCTTGA CCCACATTG ATTGAATACG TCCCCCAGAG CTTCAGTGA 900
ACATGTTGGC TTGTGCCAAG TGAGAGCAAT CGTACCTCAT CTCATCATAT ATGGATATAT 960
GTCGTATACC TGCTTCCGAA GGTGAAAGT CAAGGATGGA AAAGAAAAAG CAGGAGAGTT 1020
CTAGATTCAT GCGGGGAGT GGTGTGCTG TTAATAACTT ACTCCGTA CTCTCTACGA 1080
CTGCCAGCTG ATATTGATAT GAATATCGAA TGATGATTGG CTGGATGGG TTTGTTCCGA 1140
AAGAGGGTTA GTTCGTTGTG CAAGGGTAGA TTTTACGATT GGAAGATAAT GTGGGATAGG 1200
GCTAACCGCG CCTGCCTGAA CCCTCAGGCC GGAGCCGGGT GTTACATACT GACCGCCAG 1260
CGGCTGAGTT AATGAGAACA TACACATGAT TCGAAGTTTC AGGTCGATGG TGGAGGGGAT 1320
ACATTCAAAA TTAGTACTTA AGAGAATTAA ATACGAGGCT AATGAGGTTA ACTGCTCTAC 1380
TTACCCACAG AGAGGAGGAA AAATGCAACC ATCATCGTTT GGTGCTGTTG CTCATGTGAT 1440
CTTCAATCAC CTGACTCTGA ACCCGTTAAG CGAGACTTGG CAGAAATCGG AATGCACACC 1500
AAAATTGCCC ATCCTCACAA CCACCCGAAC AACATCGCAG CTTTCGAGGT CGACAACTAA 1560
TACGCCAAA 1569

```

【0064】配列番号：6

配列の種類：Genomic DNA

配列の長さ：1631

起源

配列の型：核酸

生物名：アスペルギルス・オリゼ

鎖の数：二本鎖

配列の特徴

トポロジー：直鎖状

特徴を示す記号：promoter

配列

```

CAGGTATTTT CTTTACTCGG TCCAGCCTTA CCATTTCCCT GCATTGAATG ACAACACTGT 60
CGCATTTTTT ATACGCCAAT AATAGCCATG GCCATTCTCT CACAACATCA CAGGTCAAGC 120
AGACTGCAAG TGGTTTCTTG TGGTGGCTGT ACTATCAAAA CGATAGAATT CCCATTGCT 180
TCGTTGGCGG TAGTAACCCC CACCAATGCT TTGTGGACTT GATGAAGTGT ACACGTCCAC 240
TGCTGTCAA AATGGCACGT AATACATTCC AATCCACAGG CTAGAAGGCT TGTGCGGTGT 300
CCACAGACGA TCAATCCTCA TAGGTTTCTG ACAGTCTCAC CCAGTGTTAG CCGTCGATGC 360
GGTCTCCGTG GTTATGCTTT CATTATCACT CCATATGTCT CTGCTCTCCC TCTCCACTGC 420
GGCATAGCT TGAGCAACCT CCTCAAGCTT AGCTACCACA TCCAATACGC CGTTGTTGAC 480
CCTATCGAAA TAGCGATCAT TCGCTTCACG CCTCTCGCGT GCCAGAAGAA TGTCTTTTC 540
TGTTTCTCA TCTAGATTCC TCTGGGAGGC ATCATCCGTT GCGGTTTGTT CTCCCGTGTG 600
ACTAGTGCCA GGAGAGGATG CTCTTGCTCT TGATTGACTC TTGTAGCTG CATTCTTCGG 660
ATCAACTACC TCATCAGCTT CGCTTCGAGC CCAGGCCTGG GCAAGCCTCA GCTGCTTTGT 720
TCGCAGGTCT TCAAGGGCCT CAGAGTGCTT TTCGCCAAG ACATGTTTAC TAGCTACCGC 780
ACTCAGCTCG ACCTCTGACA AGGCATTCTG CATTTCCTGC CAGATGGCGT CCGAGCGATC 840
AAGTTCCGCT TTTGATTGTG TACGAGATAG AAAGGGGGAG AGAGAGCCTG GGGTCTCAAG 900
GCCGCCTTGC TGGCGCGAGG AACGATTCCG CTGCAGCGCA GGACGCTGAA CCCCTCCACC 960
GGGAGAAACC GAGGGCACCG GAGGTGTGAG AGATATGTTA GATCCATTAT GGAAGTGGG 1020
TGGACCTTGA AAAAGAACAG GGGGAGGAG ACGGCAGAG GGAATTTTCC TCAGATTCTC 1080
TAATTTTGA GCCGATCCA TGGTGTTCCG GAAGTATACG TTGTTGGCAG GCGAACTAAA 1140
ACAGACAAG CTCCAATTGA CAGCCGTAAA TAAAGGGAGC TTAATCTCCG CATACAATCA 1200
ATGCTGACGG TCACTGATAA GGGGCTTATC CATATCGGAG AACGGCGGAA GTTGTTCGA 1260
TCCCGTGCCT CGCTTAGCGG CCGATTAGGG CGGAGCGCGC ACAGCAGAAC ATTTTGGTGA 1320
GCCTTCAGCG ACACCGCCGG CCGTGAAGG AACCCCTTCA CTCTCGACAA CCATCCCCAT 1380
CAGGCCTTTC GGCAATCTAT ATCAGTCGGT ATGTATATTG TTGCTGCTAT TTTTGTATGA 1440
AATATATTCC TGTCTAGGGA CTCCCGTTCA ACATCGAATC TTTTGATTTT TGATTTTCCA 1500
CCGCCCCGGC CATGTACTTC TGAATCCAC GTCCCTCCA CAAATCACGA AATCACAAG 1560
CATCAGATTG CCACAGCAAG ATCTAACGCA TTCTCTTCT ACAGACCGTC CTTGGAACAT 1620
AATCCGCCAA G 1631

```

【図面の簡単な説明】

ターの単離法を示す図である。

【図1】 本発明のグルコース存在下で発現するプロモーター

【図1】

